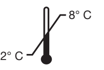
Lipoprint®
LDL Subfractions Kit

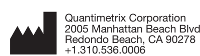


 48-7002   

MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany







Quantimetrix Corporation
2005 Manhattan Beach Blvd.
Redondo Beach, CA 90278
+1.310.536.0006

Français

UTILISATION PRÉVUE ET MODE D'EMPLOI

Le kit de sous-fractions de LDL du système Lipoprint de Quantimetrix («kit Lipoprint LDL») est un dispositif destiné à mesurer le taux de cholestérol lipoprotéine (pour les fractions et sous-fractions de lipoprotéines VLDL à HDL) dans le sérum ou le plasma à jeun pour une concentration de cholestérol total >100 mg/dl. Associées à d'autres tests lipidiques, à une détermination du risque pour le patient et à une évaluation clinique, les mesures de taux de cholestérol lipoprotéine aident à évaluer les troubles du métabolisme lipidique.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les lipoprotéines du plasma sont des particules sphériques responsables du transport du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides. Il existe cinq classes principales de lipoprotéines : chylomicrons, lipoprotéine de très basse densité (VLDL), lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), lipoprotéine de basse densité (LDL) et lipoprotéine de haute densité (HDL). Un faible taux de cholestérol HDL constitue un prédicteur indépendant fort de maladie coronarienne (MC) [1]. Un taux de cholestérol LDL (LDL-C) en augmentation a été identifié comme facteur de risque majeur de MC [2]. Il est notoire que les classes de lipoprotéines sont hétérogènes puisqu'elles sont constituées d'un ensemble de sous-fractions diversifiées sur le plan de la taille des particules, de la densité et de la composition chimique. Cette hétérogénéité a été démontrée par divers procédés analytiques, tels que l'ultracentri-fugation en gradient de densité [3], la résonance magnétique nucléaire (RMN) [4], l'électrophorèse en gradient de gel non dénaturant [5] ainsi que par le système Lipoprint qui est un système linéaire d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide [6].

Le système Lipoprint est en mesure de décomposer les LDL en un maximum de sept sous-fractions. Celles-ci sont numérotées de LDL-1 pour les particules les plus grosses à LDL-7 pour les plus petites.

Les différences en matière d'hétérogénéité des LDL chez les sujets sont liées à la fois à des facteurs génétiques et environnementaux. Il est connu que l'âge, le sexe et le bilan lipidique affectent le profil des sous-fractions de LDL [7]. Les individus présentant des profils de lipoprotéines constitués principalement de sous-fractions plus grosses et flottantes (sous-fractions LDL-1 et LDL-2) sont qualifiés de **Pattern A**, tandis que ceux présentant surtout des sous-fractions plus petites et plus denses (sous-fractions LDL-3 à LDL-7) appartiennent au **Pattern B** [5] (fig. 1)

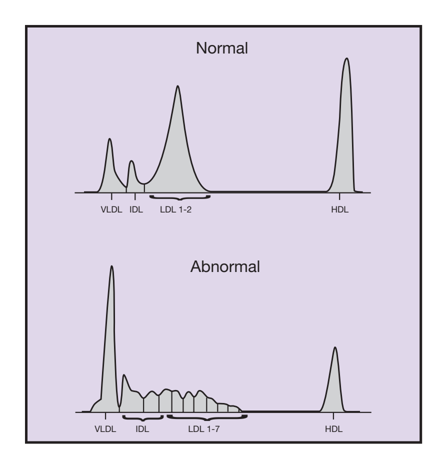


Figure 1. Profils de lipoprotéines normaux (Pattern A) et anormaux (Pattern B)

Dans une étude portant sur 109 patients atteints d'infarctus du myocarde (IM), Austin et al. [5] ont mis en évidence que la sous-fraction de LDL du Pattern B allait de pair avec un triplement du risque d'IM, indépendamment du sexe, de l'âge et du poids relatif. Krauss [8] a fait état de découvertes similaires. Rajman et al. [6] ont également documenté le facteur de risque associé aux sous-fractions de lipoprotéines de basse densité chez les hommes présentant des taux normaux de triglycérides.

PRINCIPE DU TEST

Le kit Lipoprint LDL comprend les éléments suivants:

- gel de polyacrylamide linéaire prémoulé (gel de concentration et gel de séparation) dans un tube en verre (fig. 2)
- gel de chargement liquide contenant un colorant lipophile
- sels tampons

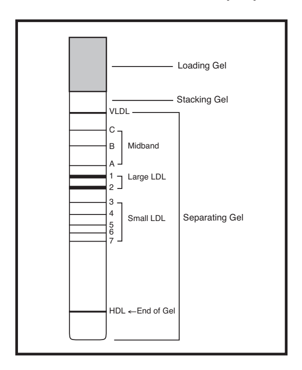


Figure 2. Schéma du tube de gel Lipoprint

Le colorant se fixe proportionnellement à la quantité relative de cholestérol dans chaque lipoprotéine [9]. Les lipoprotéines précolorées sont ensuite soumises à l'électrophorèse. Au cours de la première phase de l'électrophorèse, les particules de lipoprotéine sont concentrées par les gels de chargement et de concentration dans une bande étroite et nette. À mesure que migrent les particules de lipoprotéine au travers de la matrice de gel de séparation, elles se répartissent en bandes de lipoprotéines en fonction de la taille de leurs particules, des plus grosses aux plus petites, sous l'action de tamisage du gel : ce sont les lipoprotéines HDL qui migrent le plus loin, suivies par les LDL à petites particules denses, puis par les LDL à particules plus grosses et flottantes, par les bandes intermédiaires (constituées principalement d'IDL) et enfin par les VLDL. Les chylomicrons éventuellement présents apparaissent au-dessus du gel de concentration ou restent dans le gel de chargement.

Un profil Lipoprint type comprend 1 bande de VLDL, 3 bandes intermédiaires, jusqu'à 7 bandes de LDL et 1 bande de HDL. À la fin de l'électrophorèse, les diverses fractions de lipoprotéines colorées (bandes) présentes dans l'échantillon sont identifiées par leur mobilité (Rf), les VLDL servant de point de référence de départ (VLDL = 0) et les HDL de point de référence principal (HDL = 1) (fig. 3).

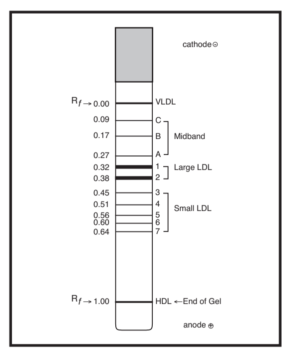


Figure 3. Mobilité des bandes de lipoprotéines

La zone relative de chaque bande de lipoprotéines est déterminée et multipliée par la concentration de cholestérol total de l'échantillon afin d'obtenir la quantité de cholestérol de chaque bande en mg/dl. La concentration de cholestérol total de l'échantillon doit être mesurée indépendamment, par exemple, à l'aide d'un analyseur clinique ou d'un instrument installé au poste de soins.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le kit Lipoprint LDL comprend des tubes de gel de polyacrylamide haute résolution prémoulé, une solution de gel de chargement contenant un colorant lipophile et des sels tampons.

Réactifs et matérielsn (fournis, voir catalogue Quantimetrix n° 48-7002)
Un kit de 100 tests comprend les éléments suivants:

1. tubes de gel Lipoprint LDL polyacrylamide, tampon, conservateur	100 tubes
2. gel de chargement Lipoprint LDL acrylamide N,N'-méthylène-bis-acrylamide colorant lipophile catalyseur stabilisateur tampon	24 ml
3. sels tampons Lipoprint LDL tris(hydroxyméthyl)aminométhane acide borique	6 flacons
4. notice d'utilisation Lipoprint LDL	1

Système Lipoprint (non fourni, voir catalogue Quantimetrix n° 48-91500/9152)
1. ordinateur (équipé du programme d'analyse LipoWare)
2. imprimante couleur
3. scanner numérique
4. chambre d'électrophorèse
5. alimentation électrique (120 V/220 V)
6. portoir pour préparation
7. éclairage pour préparation
8. outil de décollage

Liposure – contrôle de lipoprotéines (non fourni, voir catalogues Quantimetrix n° 48-7060 – niveau 1)

Matériels requis (non fournis)
1. eau distillée ou déminéralisée
2. pipeteur automatique 25 µl
3. pipeteur automatique 200 µl
4. agitateur magnétique
5. Parafilm™
6. cylindres gradués

Reconstitution des réactifs

La solution tampon électrolytique est reconstituée par dissolution d'un flacon de sels tampons du kit Lipoprint LDL dans 1 200 ml d'eau distillée ou déminéralisée.

Stockage et stabilité

Les tubes de gel, le gel de chargement et les sels tampons doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Dans des conditions de stockage adéquates, les réactifs, ouverts ou non, sont stables jusqu'à la date de péremption.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement

- Utiliser le kit Lipoprint LDL conformément aux instructions de la notice d’utilisation Lipoprint.
- Le gel de chargement contient de l’acrylamide qui est toxique en cas de contact cutané ou en cas d’ingestion. L’exposition prolongée au gel de chargement et son inhalation sont à proscrire.
- Le gel de chargement, qui est photosensible, est conditionné dans un flacon en verre ambré.
- La pipette ne doit jamais être portée à la bouche ; tout contact physique avec les réactifs et les spécimens doit être évité.
- Tout échantillon, réactif ou contrôle doit être traité comme potentiellement infectieux en cas d’ingestion ou d’absorption par contact cutané prolongé. Les précautions en vigueur dans votre établissement en matière de manipulation et d’élimination des matériels doivent être systématiquement respectées.

SPÉCIMENS ET PRÉLÈVEMENT

- Seuls des échantillons à jeun (12 heures) doivent être utilisés.
- Du sérum ou du plasma EDTA peut être utilisé (voir p. 15).
- Ne pas utiliser d’héparine comme anticoagulant.
- Les échantillons peuvent être conservés pendant un maximum de 7 jours entre 2 et 8 °C.
- La congélation d’un échantillon est déconseillée. Si toutefois elle s’avère indispensable, il faut utiliser un procédé cryogénique (–70 °C ou température inférieure).

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Préparer la solution tampon électrolytique selon la méthode décrite de dissolution d’un flacon de sels tampons dans 1 200 ml d’eau distillée ou déminéralisée.
2. Sortir les tubes de gel du bocal, les essuyer et les placer dans le portoir pour préparation, extrémité non remplie tournée vers le haut (fig. 4). Éviter de toucher les extrémités du tube de gel ou d’exercer une pression sur les gels, car cela risque d’y entraîner la formation de bulles d’air. Dans ce cas ou si le gel dépasse du tube, ne pas l’utiliser.
3. Débarrasser complètement les gels du tampon de stockage qui les recouvre en retournant le portoir, puis en le secouant. Le cas échéant, éponger l’extrémité des tubes pendant qu’ils sont retournés afin d’éliminer l’excès de tampon se trouvant encore à l’intérieur.
4. Verser 25 µl d’échantillon dans chaque tube (fig. 4).

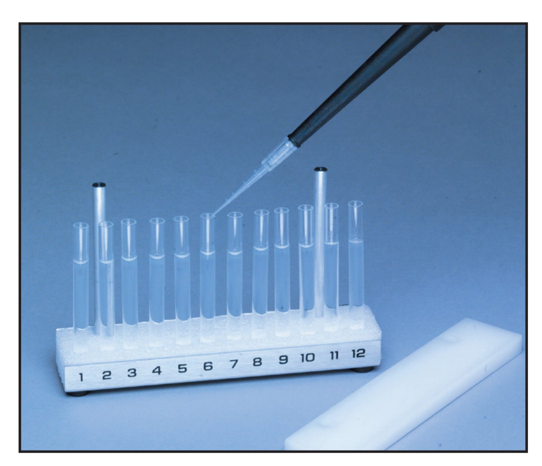


Figure 4. Application d’échantillon

5. Ajouter 200 µl de gel de chargement Lipoprint dans chaque tube.
6. Placer une bande de Parafilm entre les tubes de gel et le couvercle du portoir pour préparation pour empêcher toute contamination. Mélanger le gel de chargement au spécimen en retournant plusieurs fois de suite le portoir pour préparation (fig. 5).

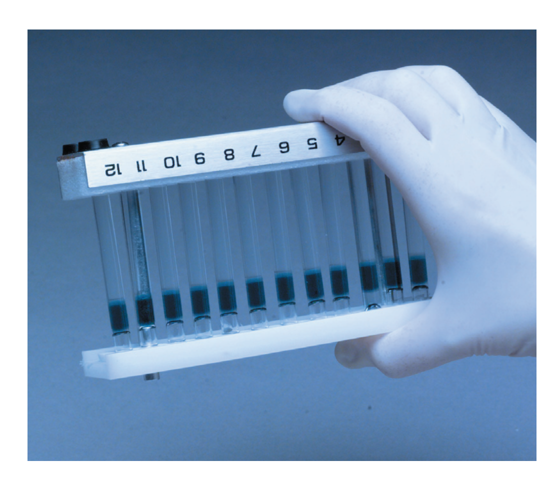


Figure 5. Mélange du gel de chargement et des spécimens

7. Mettre l'éclairage pour préparation en position verticale avec l'ampoule en haut. Placer le portoir pour préparation chargé de façon à ce que le gel de chargement soit en contact avec l'ampoule (fig. 6). Photopolymériser les gels de chargement pendant 30 minutes (sans dépasser 40 minutes).

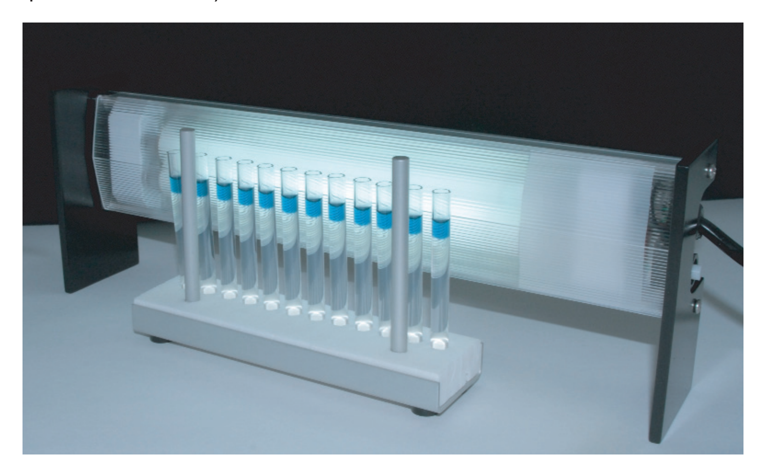


Figure 6. Photopolymérisation

8. À l'issue de la photopolymérisation, retirer chaque tube de gel du portoir pour préparation et l'insérer avec précaution dans l'adaptateur en silicone de la chambre supérieure. Tout en tenant le tube de gel par le côté, le pousser vers le haut jusqu'à ce que l'extrémité où se trouve le gel de chargement soit au même niveau que la partie supérieure de l'adaptateur. Humecter le haut du tube de gel pour faciliter son insertion. Éviter de toucher les extrémités du tube pendant cette étape. Si l'opération est réalisée sur une chambre partiellement vide, boucher les adaptateurs non utilisés à l'aide des petits tubes en verre prévus à cet effet. Pousser les tubes en appuyant dessus jusqu'à ce qu'ils soient au même niveau que la partie inférieure de l'adaptateur (fig. 7).

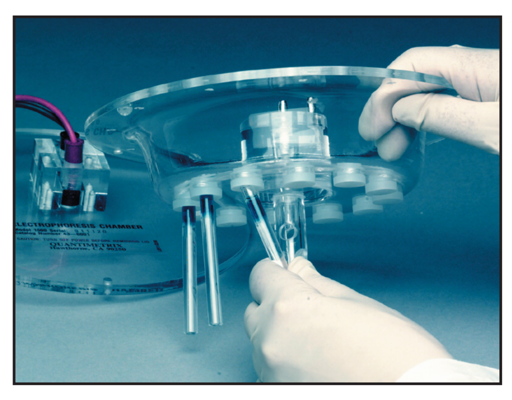


Figure 7. Chargement des tubes

9. Placer 1000 ml de solution tampon électrolytique dans la chambre inférieure et 200 ml dans la chambre supérieure. Le tampon de la chambre inférieure peut être utilisé au maximum cinq fois. Dans la chambre supérieure, le tampon doit être renouvelé à chaque fois. Le tampon doit être à température ambiante (c'est-à-dire entre 18 et 27 °C).
10. Une fois les deux chambres assemblées et remplies de tampon, vérifier soigneusement qu'aucun tube ne contient de bulles d'air. S'il y en a, utiliser l'embout du pipeteur pour les déloger, car elles risquent d'obstruer le passage du courant électrique.
11. Mettre en place le couvercle de la chambre d'électrophorèse et brancher celle-ci sur la source d'alimentation (fig. 8). Régler la source d'alimentation pour délivrer un courant de 3 mA par tube de gel (ex. : 36 mA pour 12 tubes, 18 mA pour 6 tubes, etc.). La tension doit être réglée à la puissance maximum (500 V).

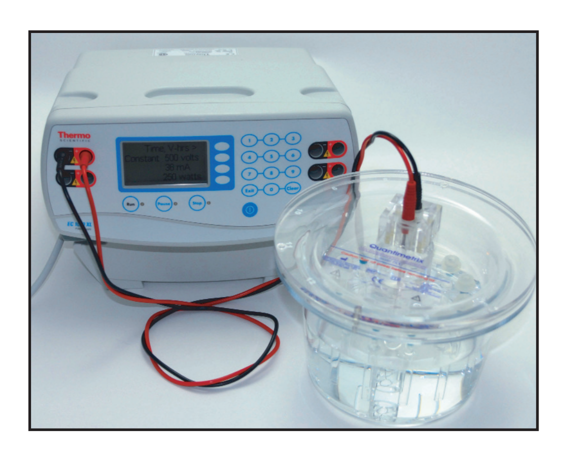


Figure 8. Chambre assemblée

12. L'électrophorèse dure approximativement 60 minutes. Arrêter l'électrophorèse lorsque la fraction HDL se trouve à environ 1 cm du bas du tube de gel dont la migration est la plus rapide.
13. Une fois l'électrophorèse terminée, couper l'alimentation, ôter le couvercle de la chambre et jeter le tampon électrolytique se trouvant dans la chambre supérieure. Le tampon de la chambre inférieure peut y rester et être utilisé jusqu'à 5 fois. Ne pas le conserver plus de 7 jours.
14. Avant de retirer les tubes de gel de la chambre d'électrophorèse, essuyer l'excès de tampon. Les placer ensuite dans le portoir pour préparation afin de les transporter jusqu'au scanner pour analyse. Laissez les tubes de gel reposer entre 30 minutes minimum et 2 heures maximum avant de les analyser au scanner.

Remarque méthodologique: *Au cours de l'électrophorèse, il peut se produire une distorsion de la surface du gel de séparation et de la bande VLDL. Il est possible de remédier à cette distorsion après le retrait des gels de la chambre d'électrophorèse en introduisant avec précaution l'outil de décollage le long du verre depuis le haut du gel de chargement, et en décollant la surface du gel de séparation avec un mouvement circulaire. Le gel reprend alors sa forme normale. Éviter de déloger le gel de chargement en retirant l'outil (si du gel part avec l'outil, combler le vide avec de l'eau déminéralisée ou distillée).*

CONTRÔLE DE QUALITÉ

La fiabilité des résultats des tests doit être régulièrement vérifiée à l'aide d'un matériel de contrôle capable d'émuler de façon satisfaisante la performance des spécimens patient. Il est recommandé d'utiliser le matériel de contrôle de qualité avec chaque série d'échantillons patient. Le matériel de contrôle est uniquement destiné à évaluer la justesse et la précision des mesures. Un taux de recouvrement des valeurs de contrôle situé dans les fourchettes appropriées doit constituer le critère de validation de la performance du dosage.

Les procédures de contrôle de qualité doivent être effectuées conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur ou aux exigences en matière d'accréditation. Quantimetrix Corporation propose son propre matériel de contrôle de la qualité, Liposure.

RÉSULTATS QUALITATIFS

Remarque: *Les bandes d'un profil Lipoprint peuvent être identifiées à l'aide du gabarit Lipoprint en vue d'une évaluation qualitative (homogénéité ou hétérogénéité de la répartition des LDL).*

Le profil des lipoprotéines reflète le bilan lipidique de l'échantillon patient (fig. 9). Un profil des lipoprotéines normal (Pattern A) fait généralement apparaître des bandes pour les VLDL, des bandes intermédiaires C, B et A (qui englobent les IDL) et des bandes LDL-1, LDL-2 et HDL. La présence de sous-fractions supplémentaires de LDL (LDL-3 à 7) indique l'hétérogénéité des LDL (révélatrice du Pattern B).

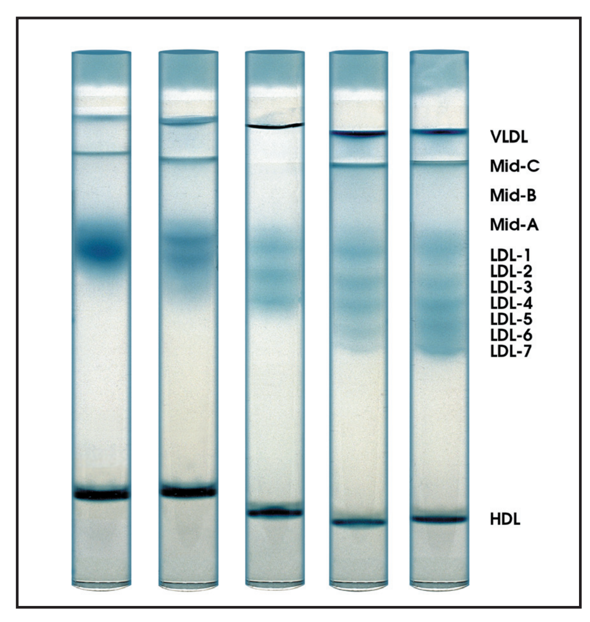


Figure 9. Répartition des sous-fractions de lipoprotéines chez cinq individus – de gauche à droite : pattern de LDL allant d'homogène à de plus en plus hétérogène.

Utilisation du gabarit Lipoprint

Le gabarit du système Lipoprint LDL permet d’identifier les sous-fractions de lipoprotéines présentes dans le gel (fig. 10).

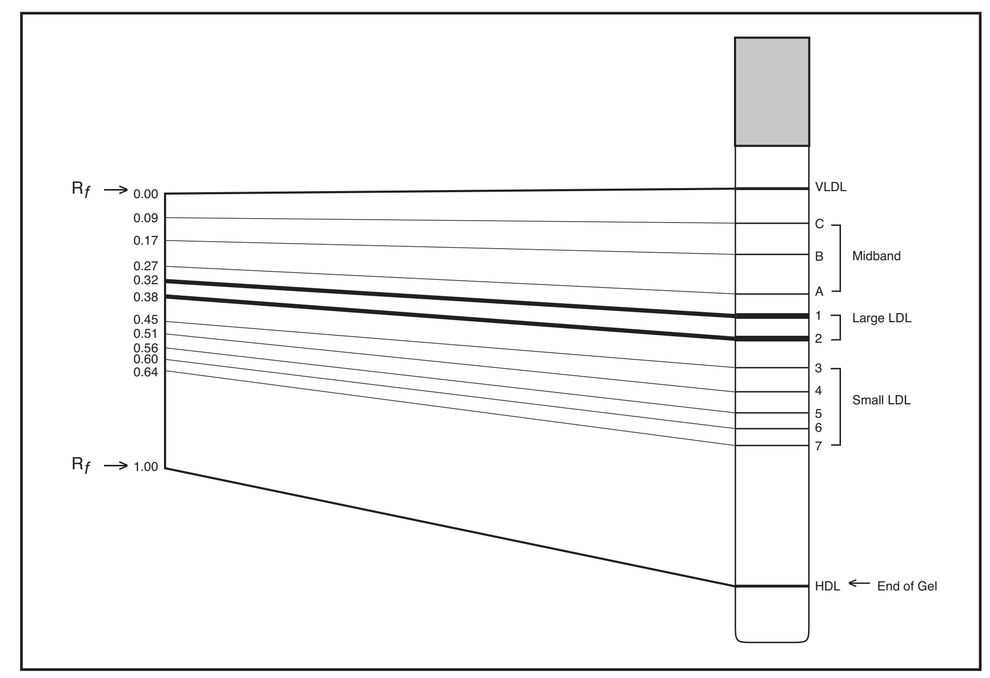


Figure 10. Gabarit des sous-fractions de LDL du système Lipoprint

1. À l’aide d’un marqueur, faire un trait sur le tube en verre au centre de chaque bande de lipoprotéines présente.
2. Aligner la fraction VLDL située au sommet du gel de séparation sur la ligne du gabarit marquée «VLDL».
3. Faire glisser le gel le long du gabarit jusqu’à ce que la bande HDL soit superposée à la ligne «HDL».
4. Déterminer les sous-fractions de lipoprotéines présentes dans l’échantillon en appariant les bandes du gel aux lignes correspondantes du gabarit.

RÉSULTATS QUANTITATIFS

Remarque: *La valeur de cholestérol total de chaque échantillon à analyser doit être obtenue à l’aide d’une technique cliniquement agréée avant de générer les résultats quantitatifs.* ***La concentration de cholestérol total de l’échantillon doit être >100 mg/dl.***

Les tubes de gel sont numérisés et la zone relative correspondant à chaque sous-fraction de lipoprotéines est déterminée par l’ajout de traits verticaux au niveau des seuils limites prédéterminés pour chaque bande. La quantité de cholestérol présente dans chaque bande de lipoprotéines est calculée en multipliant la zone relative de chaque bande par le cholestérol total de l’échantillon. Le cholestérol LDL est calculé comme la somme des concentrations de cholestérol de toutes les sous-fractions de LDL plus les bandes intermédiaires A, B et C.

Les profils de sous-fractions de lipoprotéines sont généralement classifiés en type A (normal) et type B (anormal) en fonction de la taille moyenne des particules de LDL [5]. Un profil Lipoprint normal comportant principalement des LDL à grosses particules (LDL-1 et LDL-2) correspond au type A (fig. 11).

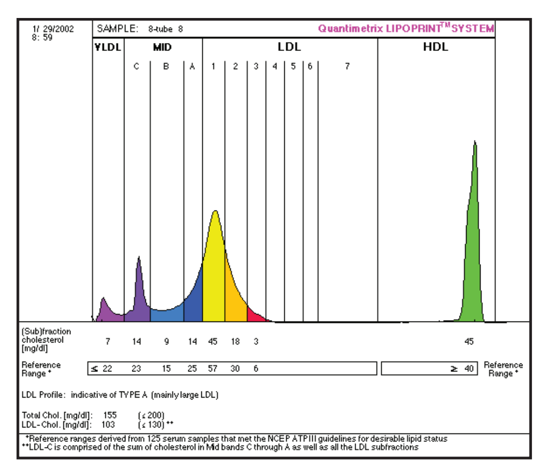


Figure 11. Profil Lipoprint normal type

De même, un profil Lipoprint anormal comportant principalement des LDL à petites particules (LDL-3 à LDL-7) correspond au type B décrit dans la documentation (fig. 12).

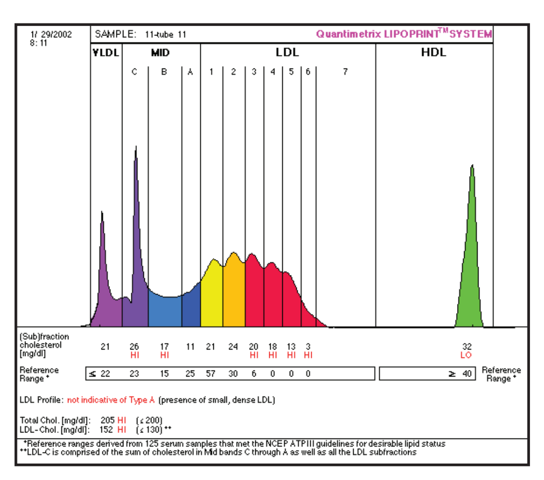


Figure 12. Profil Lipoprint anormal type

LIMITES

- Le test Lipoprint LDL doit être associé à d'autres données (ex. : tests cliniques complémentaires, observations du médecin, antécédents familiaux, etc.).
- L'héparine interfère avec la séparation des sous-fractions de LDL.
- Le cholestérol total de l'échantillon doit être supérieur à 100 mg/dl pour éviter toute surestimation du cholestérol VLDL.
- La présence de chylomicrons dans l'échantillon invalide la mesure du cholestérol dans les sous-fractions. L'aspect du spécimen (nébulosité, turbidité ou couche crémeuse sur le dessus de l'échantillon) après réfrigération jusqu'au lendemain permet de confirmer la présence de chylomicrons.
- Les résultats du test Lipoprint n'ont pas été évalués en cas de test de lipoprotéines durant la grossesse.
- Les experts du NCEP (National Cholesterol Education Program, programme national américain de formation sur le cholestérol) n'ont pas publié de directives relatives aux valeurs optimales/souhaitables pour les sous-fractions de LDL.

VALEURS ATTENDUES

HDL-C und LDL-C

Les limites pour les taux de cholestérol LDL et HDL liées à un risque pour la santé du patient avaient été établies dans le cadre du NCEP. Elles ont été réaffirmées en mai 2001 par le troisième rapport du NCEP, Adult Treatment Panel (ATP III) [10]:

Fraction	**Plage**	**État**
HDL-C	≥ 40 mg/dl	Diminution du risque aux niveaux élevés
	< 40 mg/dl	Augmentation du risque
LDL-C	≤ 100 mg/dl	Optimal pour les patients atteints de maladie coronarienne (MC)
	< 130 mg/dl	Souhaitable
	130 - 159 mg/dl	Risque marginal élevé
	≥ 160 mg/dl	Risque élevé

Le LDL-C comprend toutes les particules de lipoprotéines pour lesquelles d > 1,006 à 1,063 kg/l, telles que les résidus de VLDL, IDL, Lp(a) et LDL [2]. Ces particules correspondent à la somme des bandes intermédiaires et des sous-fractions de LDL décomposées par le système Lipoprint.

Répartition du cholestérol par sous-fraction

Les valeurs normales attendues pour chaque sous-fraction sur le système Lipoprint ont été établies comme suit : Un ensemble de personnes se déclarant en bonne santé ont été recrutées (composition : N = 273, âge = 18–85 ans, femmes = 166, hommes = 107, blancs 47 %, hispaniques 18 %, asiatiques 16 %, noirs 5 %, non déclarés 14 %). Il a été demandé à ces volontaires de jeûner pendant 12 heures. Du sang total a été prélevé par ponction veineuse dans un tube à sérum. Les échantillons de sérum ont ensuite été utilisés pour tester les paramètres lipidiques indiqués et générer les profils de lipoprotéines à l'aide du système Lipoprint LDL.

Les critères d'exclusion comprenaient les diabétiques, les personnes prenant des hypolipidémiants et les patients ayant eu récemment une crise cardiaque. En outre, les femmes enceintes étaient exclues de l'étude à cause de la modification de leur bilan lipidique [12].

Seuls les échantillons satisfaisant aux conditions indiquées dans les directives NCEP/ATP III en matière de bilan lipidique souhaitable [10], à savoir CT < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 40 mg/dl et triglycérides < 150 mg/dl, ont été utilisés dans le cadre de la détermination des valeurs attendues. Les échantillons normaux, N = 114 (32 % d'hommes et 68 % de femmes âgés de 18 à 84 ans), ont servi à établir les valeurs normales attendues, définies comme appartenant à un intervalle de confiance de 95 % (écart-type moyen ± 2) pour chaque paramètre lipidique obtenu par le système Lipoprint LDL (tableau 1).

Tableau 1. Population normale

		Cholestérol bandes intermédiaires			Cholestérol sous-fraction LDL					
	VLDL (mg/dl)	Interm. C (mg/dl)	Interm. B (mg/dl)	Interm. A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CT (mg/dl)
Fourchette	6 - 26	9 - 24	5 - 17	6 - 26	24 - 59	4 - 32	0 - 4	59 - 128	40 - 103	123 - 199
Moyenne	12,9	16,5	10,1	16,6	41,1	14,3	1,9	95,7	56,8	168,1
Écart-type	4,12	2,82	2,40	4,26	7,85	6,82	0,81	16,56	11,29	18,45
95% Fourchette	4,7 - 22,1	10,9 - 22,1	5,3 - 14,9	8,1 - 25,1	25,4 - 56,8	0,7 - 28,6	0 - 3,6	62,5 - 128,8	40,0 - 79,4	131,2 - 200,0
N*	114	114	114	114	114	114	44	114	114	114

* Nombre d'echantillons affichant les fractions respectives.

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir sa propre fourchette de valeurs normales qui peut être spécifique à une population donnée, en fonction de facteurs géographiques, environnementaux ou propres aux patients.

Les données relatives à la population dont les valeurs ne satisfont pas aux recommandations NCEP (composition : N = 141, 46% d'hommes et 54% de femmes âgés de 18 à 77 ans) sont illustrées dans le tableau 2.

Tableau 2. Population non conforme aux directives NCEP

		Cholestérol bandes intermédiaires			Cholestérol sous-fraction LDL							
	VLDL (mg/dl)	Interm. C (mg/dl)	Interm. B (mg/dl)	Interm. A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL-4 (mg/dl)	LDL-5 (mg/dl)	LDL Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CT (mg/dl)
fourchette	5 - 69	9 - 40	5 - 37	5 - 34	9 - 77	7 - 55	0 - 35	0 - 28	0 - 11	58 - 215	26 - 137	104 - 319
moyenne	24,4	23,2	14,6	18,6	46,5	31,5	9,2	4,7	5,5	134,8	54,2	219,4
écart-type	13,50	5,65	5,21	6,14	15,13	10,98	7,50	6,05	3,6	27,17	18,05	35,04
95% fourchette	0 - 51,4	12,0 - 34,7	4,2 - 25,0	6,4 - 30,9	16,2 - 76,8	9,5 - 53,5	0 - 24,2	0 - 16,8	0 - 16,8	80,5 - 189,1	18,2 - 90,2	148,6 - 290,2
N*	141	141	141	141	141	141	115	44	8	141	141	141

* Nombre d'échantillons affichant les fractions respectives.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE SPÉCIFIQUES

Précision

La variabilité intra-dosage et inter-dosage de quatre échantillons a été testée. Des échantillons présentant des taux faibles, moyens et élevés de HDL-C et de LDL-C ont été sélectionnés:
Échantillon 1: LDL-C faible, HDL-C élevé et pattern homogène des LDL (LDL-1 et 2 uniquement)
Échantillon 2: LDL-C moyen, HDL-C moyen et pattern légèrement hétérogène des LDL (LDL-1, 2 et 3)
Échantillon 3: LDL élevé, HDL faible et pattern hétérogène des LDL (LDL-1, 2, 3 et 4))
Échantillon 4: LDL-C élevé, HDL-C intermédiaire et pattern hétérogène des LDL (LDL-1 à 7

Précision intra-dosage

Les échantillons ont été testés sur la base de 12 réplicats (capacité maximale de la chambre d'électrophorèse). Les résultats de précision des HDL-C, LDL-C (somme des bandes intermédiaires C, B, A et des sous-fractions de LDL) et VLDL-C sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3. Données de précision intra-dosage pour **HDL**, **LDL** und **VLDL**

Échan-tillon	N	HDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	VLDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	12	55	1,47	2,68	86	0,90	1,05	17	0,99	5,86
2	12	42	0,78	1,87	120	1,43	1,20	15	0,99	6,43
3	12	31	0,90	2,87	133	2,02	1,52	35	1,97	5,58
4	12	48	1,37	2,84	180	2,02	1,12	23	1,66	7,28

Données de précision pour les bandes intermédiaires C, B, A et les sous-fractions de LDL 1 à 7 répertoriées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4. Données de précision intra-dosage pour les sous-fractions de **BANDES INTERMÉDIAIRES**

Échan-tillon	N	Interm. C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	Interm. B Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	Interm. A Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	12	16	0,76	4,75	9	0,60	6,67	14	1,56	11,14
2	12	17	1,44	8,47	13	0,51	3,92	14	0,72	5,14
3	12	22	1,21	5,50	16	0,47	2,94	13	0,50	3,85
4	12	30	1,44	4,80	15	1,36	9,07	10	0,77	7,70

Tableau 5. Données de précision intra-dosage pour les sous-fractions de **LDL**

Échan-tillon	N	LDL-1 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-2 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-3 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-4 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	12	36	0,60	1,67	10	1,68	16,80	S/O	-	-	S/O	-	-
2	12	28	0,91	3,25	32	0,70	2,19	14	1,65	11,79	S/O	-	-
3	12	21	0,51	2,43	19	0,88	4,63	18	0,38	2,11	19	0,86	4,53
4	12	24	0,86	3,58	22	0,80	3,64	17	0,28	1,65	20	0,49	2,45

Échan-tillon	N	LDL-5 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-6 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-7 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	12	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
2	12	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
3	12	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
4	12	24	0,41	1,72	16	0,72	4,62	4	0,68	17,89

Précision inter-dosage

Des tests ont été réalisés en double sur quatre échantillons, deux fois par jour pendant 5 jours, dans 4 chambres d'électrophorèse, en utilisant un lot unique de tubes de gel. Les résultats correspondants de précision inter-dosage sont répertoriés dans les tableaux 6 à 8.

Tableau 6. Données de précision inter-dosage pour **HDL, LDL** et **VLDL**

Échan-tillon	N	HDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	VLDL-C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	80	60	1,49	2,49	94	1,41	1,50	10	0,90	9,40
2	80	46	1,45	3,15	137	1,73	1,26	11	0,91	8,27
3	80	32	1,52	4,75	160	2,03	1,27	33	2,35	7,12
4	80	50	2,32	4,69	178	2,79	1,57	23	1,97	8,57

Tableau 7. Données de précision inter-dosage pour les sous-fractions de **BANDES INTERMÉDIAIRES**

Échan-tillon	N	Interm. C Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	Interm. B Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	Interm. A Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	80	14	1,23	8,79	10	0,87	8,27	19	2,00	10,90
2	80	18	1,99	11,06	13	0,86	6,62	16	1,33	8,31
3	80	21	2,84	13,63	22	1,04	4,73	17	1,27	7,47
4	80	28	1,87	7,79	13	0,91	7,00	10	0,81	8,10

Tableau 8. Données de précision inter-dosage pour les sous-fractions de **LDL**

Échan-tillon	N	LDL-1 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-2 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-3 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-4 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	80	41	1,61	3,92	11	1,47	13,50	S/O	-	-	S/O	-	-
2	80	37	1,43	3,86	39	1,50	3,85	14	2,69	19,21	S/O	-	-
3	80	29	1,10	3,79	24	1,73	7,21	20	1,33	6,65	20	1,21	6,05
4	80	24	0,88	3,67	22	1,48	6,73	17	0,95	5,59	20	0,69	3,45

Échan-tillon	N	LDL-5 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-6 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)	LDL-7 Moyenne (mg/dl)	Écart-type	CV (%)
1	80	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
2	80	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
3	80	S/O	-	-	S/O	-	-	S/O	-	-
4	80	24	0,62	2,58	17	2,05	12,06	4	1,39	33,90

Linéarité

Des études de linéarité ont été menées sur deux échantillons de sérum enrichi de HDL-C ou de LDL-C isolé par ultracentrifugation.

Échantillon 1
LDL-C: 695 mg/dl
HDL-C: 260 mg/dl
VLDL-C: 140 mg/dl

Échantillon 2
LDL-C: 163 mg/dl
HDL-C: 178 mg/dl
VLDL-C: 38 mg/dl

Des suspensions-dilutions ont été préparées à partir d'une solution physiologique à base d'albumine sérique humaine. Les concentrations observées pour les LDL-C, HDL-C et VLDL-C totaux ont été comparées aux valeurs attendues (tableaux 9–11). Le pourcentage de recouvrement a été calculé comme suit : % recouvrement = (valeur observée/valeur attendue) x 100.

Tableau 9. Linéarité de dilution des **LDL**

Dilution (%)	LDL observé (mg/dl)	LDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	695	695	100,0
10%	627	626	100,2
30%	466	486	95,9
50%	351	348	100,9
70%	195	209	93,3
95%	59	69	85,6

Dilution (%)	LDL observé (mg/dl)	LDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	163	163	100,0
5%	155	157	98,7
10%	151	148	102,0
50%	84	89	94,4
90%	15	15	100,0
95%	13	13	100,0

Tableau 10. Linéarité de dilution des **HDL**

Dilution (%)	HDL observé (mg/dl)	HDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	260	260	100,0
10%	218	234	93,2
30%	174	182	95,9
50%	117	130	90,0
70%	73	78	93,6
90%	25	26	96,2

Dilution (%)	HDL observé (mg/dl)	HDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	178	178	100,0
5%	170	169	100,6
10%	162	160	101,3
50%	95	89	106,7
95%	11	9	122,2
97%	5	5,3	94,3

Tableau 11. Linéarité de dilution des **VLDL**

Dilution (%)	VLDL observé (mg/dl)	VLDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	140	140	100,0
10%	129	126	102,4
30%	99	98	101,0
50%	75	70	107,1
70%	48	42	115,5
90%	22	14	157,1

Dilution (%)	VLDL observé (mg/dl)	VLDL attendu (mg/dl)	Recouvrement (%)
0%	38	38	100,0
5%	36	37	97,3
10%	34	35	97,1
50%	24	24	100,0
90%	17	13	130,8
95%	13	11,4	114,0

Dose-réponse

Un échantillon de sérum A (contenant une large fourchette de sous-fractions) a été mélangé à un volume égal d'échantillon B (contenant principalement la sous-fraction LDL-2) pour produire un ensemble AB. Les échantillons ont été analysés avec le système Lipoprint, les concentrations de cholestérol de chaque fraction ont été déterminées et les valeurs observées ont été comparées aux valeurs attendues (tableau 12).

Selon la même modalité, un échantillon de sérum A (contenant une large fourchette de sous-fractions) a été mélangé à un volume égal d'échantillon de sérum C (contenant principalement la sous-fraction LDL-1) pour produire un ensemble AC. Les échantillons ont été analysés avec le système Lipoprint, les concentrations de cholestérol de chaque fraction ont été déterminées et comparées aux valeurs attendues (tableau 13).

Tabelle 12. Valeurs observées/valeurs attendues pour l'échantillon mélangé AB

	A	B	AB		
	mg/dl	mg/dl	Attendu (mg/dl)	Observé (mg/dl)	Recouvrement (%)
VLDL	35	20	28	29	103,6
Interm. C	37	20	29	28	97,6
Interm. B	35	15	25	21	84,0
Interm. A	15	15	15	15	100,0
LDL-1	21	29	25	26	104,0
LDL-2	17	49	33	37	112,1
LDL-3	14	28	21	25	119,0
LDL-4	14	5	10	12	120,0
LDL-5	12	-	6	5	83,8
LDL-6	9	-	4	2	50,0
LDL-7	15	-	7	2	28,8
HDL	29	35	32	35	109,4

Tabelle 13. Valeurs observées/valeurs attendues pour l'échantillon mélangé AC

	A	C	AC		
	mg/dl	mg/dl	Attendu (mg/dl)	Observé (mg/dl)	Recouvrement (%)
VLDL	35	13	24	25	104,2
Interm. C	37	16	27	25	92,6
Interm. B	35	11	23	18	78,3
Interm. A	15	16	16	14	87,5
LDL-1	21	54	38	36	94,8
LDL-2	17	38	28	34	121,4
LDL-3	14	7	11	16	145,4
LDL-4	14	-	7	11	157,1
LDL-5	12	-	6	5	83,3
LDL-6	9	-	4	2	50,0
LDL-7	15	-	7	2	28,6
HDL	29	40	35	37	105,7

Sensibilité

La sensibilité du système Lipoprint est définie comme la concentration minimale de HDL-C et de LDL-C total pouvant être détectée de façon fiable. Elle a été déterminée comme l'intersection de l'intervalle de confiance inférieur de 95 % de la moyenne et de l'axe des abscisses dans le cadre de la représentation graphique d'une suspension-dilution des valeurs attendues comparées au valeurs réelles pour les paramètres de lipoprotéines individuels : la sensibilité au VLDL est ≥ 2,02 mg/dl, la sensibilité au HDL est ≥ 3,65 mg/dl et la sensibilité au LDL total est ≥ 8,30 mg/dl.

Interférences

Des substances susceptibles de créer des interférences ont été ajoutées, aux concentrations indiquées au tableau 14, à des échantillons de sérum puis testées côte à côte avec des échantillons purs (4 réplicats). Il en est ressorti que l'hémoglobine aux concentrations supérieures à 200 mg/dl et l'héparine aux concentrations généralement rencontrées dans les tubes de prélèvement de plasma hépariné perturbaient le test Lipoprint.

Tableau 14. Interférences

Interférent	Conc. (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Recouvrement (%)	LDL-C (mg/dl)	Recouvrement (%)	HDL-C (mg/dl)	Recouvrement (%)
Aucun	-	17±1,1	100	115±1,9	100	42±2,4	100
Bilirubine	20	15±0,9	89	115±2,2	100	45±1,6	107
Hémoglobine	500	28±0,3	165	106±2,0	92	40±2,0	95
Hémoglobine	200	18±0,2	106	116±0,7	101	40±0,6	95
Acide nicotinique	2,5	16±0,7	94	115±1,5	100	43±2,0	102
EDTA	200	16±1,0	94	114±0,4	99	44±1,2	105
Héparine	14 U/ml	20±0,4	118	113±1,4	98	41±1,9	98

Comparaison sérum/plasma

Des échantillons de sérum et de plasma EDTA prélevés sur 37 patients ont été comparés sur le système Lipoprint. Les valeurs de cholestérol (en mg/dl) de toutes les fractions et sous-fractions de lipoprotéines (N = 322), à raison d'un maximum de 12 par échantillon, générées par le système Lipoprint, ont été représentées graphiquement et mises en corrélation:

$$\text{cholestérol}_{plasma} = 0{,}995\ (\text{cholestérol}_{sérum}) + 1{,}158 \qquad (r^2 = 0{,}971)$$

Stabilité des échantillons

Des échantillons de sérum (N = 22) couvrant une large fourchette de concentrations de cholestérol et contenant entre 7 et 12 fractions et sous-fractions ont été conservés au réfrigérateur pendant 7 jours. Le profil Lipoprint de chaque échantillon a été généré au jour 3 et au jour 7, et les valeurs de cholestérol résultantes de chaque fraction et sous-fraction de lipoprotéines (N = 206) ont été comparées:

$$\text{cholestérol}_{jour\ 3} = 0{,}996\ (\text{cholestérol}_{jour\ 0}) + 0{,}075 \qquad (r^2 = 0{,}976)$$

$$\text{cholestérol}_{jour\ 7} = 0{,}964\ (\text{cholestérol}_{jour\ 0}) + 0{,}758 \qquad (r^2 = 0{,}961)$$

Il a été conclu que le sérum et le plasma EDTA convenaient aussi bien l'un que l'autre comme spécimen et que les échantillons pouvaient être conservés réfrigérés (2–8 °C) pendant un maximum de 7 jours.

Précision par corrélation

Le système de test Lipoprint a été comparé à des méthodes directes de détermination du HDL et du LDL (HDL Direct Liquid Select et LDL Direct Liquid Select d'EQUAL Diagnostics, respectivement). Une population de 268 échantillons de sérum à des concentrations de LDL-C comprises dans les fourchettes 55–218 mg/dl (Lipoprint) et 54–215 mg/dl (méthode LDL directe), ainsi qu'à des concentrations de HDL-C de 24–129 mg/dl (Lipoprint) et 26–137 mg/dl (méthode HDL directe) a été évaluée (tableaux 15 et 16).

Tabelle 15.

	Lipoprint HDL	Direct HDL
N	268	268
Moyenne (mg/dl)	53,2	54,8
ÉT (mg/dl)	15,13	15,43
Régression	Lipoprint HDL = 0,9361 (HDL_{direct}) + 1,8607	
r^2	0,912	

Tabelle 16.

	Lipoprint LDL	Direct LDL
N	268	268
Moyenne (mg/dl)	121,9	116,3
ÉT (mg/dl)	30,73	29,58
Régression	Lipoprint LDL = 0,998 (LDL_{direct}) + 5,7995	
r^2	0,923	

Une comparaison similaire a été effectuée entre la méthode par ultracentrifugation (ß-Quantification) et le système Lipoprint LDL. Une population de 40 échantillons de sérum à des concentrations de LDL-C comprises dans les fourchettes 66–211 mg/dl (Lipoprint) et 68–218 mg/dl (ß-Quantification), ainsi qu'à des concentrations de HDL-C de 29–91 mg/dl (Lipoprint) et 28–90 mg/dl (ß-Quantification) et à des concentrations de VLDL-C de 9,5–49 mg/dl (Lipoprint) et 6–57 mg/dl (ß-Quantification) a été évaluée (tableaux 17–19).

Tabelle 17.

	Lipoprint LDL	ß-Quant LDL
N	40	40
Moyenne (mg/dl)	130,8	130,0
ÉT (mg/dl)	30,14	30,42
Régression	Lipoprint LDL = 0,933 ($LDL_{ß\text{-}Quant}$) + 9,430	
r^2	0,887	

Tabelle 18.

	Lipoprint HDL	ß-Quant HDL
N	40	40
Moyenne (mg/dl)	53,5	53,5
ÉT (mg/dl)	15,29	15,71
Régression	Lipoprint HDL = 0,944 ($HDL_{ß\text{-}Quant}$) + 3,030	
r^2	0,941	

Table 19.

	Lipoprint VLDL	ß-Quant VLDL
N	40	40
Moyenne (mg/dl)	24,7	22,9
ÉT (mg/dl)	10,34	12,61
Régression	Lipoprint VLDL = 0,689 ($VLDL_{ß\text{-}Quant}$) + 7,990	
r^2	0,8216	

LITERATUR

1. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem* 1995; 41/10: 1427-1433.
2. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem* 1995; 41/10: 1414-1420.
3. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990; 83(1): 59-67.
4. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *In: Handbook of Lipoprotein Testing*, Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. AACC Press 1999, 2nd edition, Washington, DC. Pages 609-623.
5. Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Current Opinion in Lipidology* 1994; 5(6): 395-403.
6. Rajman I, Kendall MJ, Cramb R, Holder RL, Salih M, Gammage MD. Investigation of low density lipoprotein subfractions as a coronary risk factor in normotriglyceridaemic men. *Atherosclerosis* 1996; 125(2): 231-242.
7. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 483-490.
8. Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass and risk of coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology* 1991; 2: 248-252.
9. Muñiz N. Measurement of plasma lipoproteins by electrophoresis on polyacrylamide gel. *Clin Chem* 1977; 23: 1826-1833.
10. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Executive Summary. *NIH Publication* No. 01-3670, May 2001.
11. Stein E, Greer IA, Myers GL. National Cholesterol Education Program recommendations for triglyceride measurement. *Clin Chem* 1995; 41: 421-1426.
12. Sattar N, Greer IA, Louden J, Lindsay G, McConnel M, Shepherd J, Packard C. Lipoprotein Subfraction Changes in Normal Pregnancy. *J. Clin Endocrin. Metab* 1997; 82: 2483-2491.

ASSISTANCE TECHNIQHE

- Téléphone: +1.310.536.0006
- Fax: +1.310.536.0323
- Courriel: lipoprint@quantimetrix.com
- Site Web: www.quantimetrix.com